



10/031516

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT
A-1014 WIEN, KOHLMARKT 8 – 10

Schriftengebühr € 52,00

Aktenzeichen **A 853/2000**

Das Österreichische Patentamt bestätigt, dass

**die Firma AVL LIST GMBH
in A-8020 Graz, Hans-List-Platz 1
(Steiermark),**

am **16. Mai 2000** eine Patentanmeldung betreffend

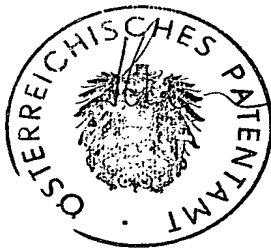
"Creatinin-Sensor",

überreicht hat und dass die beigeheftete Beschreibung mit der
ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten
Beschreibung übereinstimmt.

Österreichisches Patentamt
Wien, am 11. Jänner 2002

Der Präsident:

i. A.



HRNCIR
Fachoberinspektor

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT
Verwaltungsstellen-Direktion

€ 11,- (S 151,36)

Kanzleigegebühr bezahlt.

Ballaum

A 853/2000 014288

A 4520

Urtext

⑪ Nr.

AT PATENTSCHRIFT

⑦③ Patentinhaber: AVL LIST GMBH
A-8020 Graz/AT

⑤④ Gegenstand : Creatinin-Sensor

⑥① Zusatz zu Patent Nr.

⑥⑦ Umwandlung aus GM

⑥② Ausscheidung aus :

②② ②① Angemeldet am:

③③ ③② ③① Unionspriorität :

④② Beginn der Patentdauer:
Längste mögliche Dauer:

④⑤ Ausgegeben am :

⑦② Erfinder :

⑥① Abhängigkeit:

⑤⑥ Entgegenhaltungen, die für die Beurteilung der Patentierbarkeit in Betracht gezogen wurden:

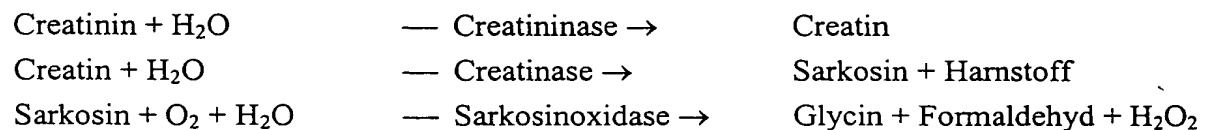
Creatinin-Sensor

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Biosensoren mit mindestens zwei Enzymen zur amperometrischen Bestimmung enzymatisch abbaubarer Stoffe in biologischen Flüssigkeiten; wobei die Enzyme an einer Arbeitselektrode immobilisiert werden. Die Erfindung betrifft weiters einen Biosensor, insbesondere zur Bestimmung von Creatinin.

Die Bestimmung enzymatisch abbaubarer Stoffe, wie Creatinin, Glucose, etc., mittels Sensoren in biologischen Flüssigkeiten, zum Beispiel in Blut, Urin, Plasma, Serum und Liquor, erfolgt vorzugsweise über Biosensoren mit immobilisierten Enzymen. In der Literatur sind mehrere elektrochemische und photometrische Verfahren zur Bestimmung dieser Stoffe bekannt.

So kann beispielsweise über das Enzym Creatinine Deiminase mit nachfolgender Bestimmung des Ammoniumgehalts Creatinin potentiometrisch bestimmt werden. Ein anderes Verfahren besteht darin, die Creatininkonzentration über eine Enzymkaskade unter Verwendung der Enzyme Creatininase, Creatinase und Sarkosinoxidase zu bestimmen, wobei letztendlich Wasserstoffperoxid (H_2O_2) an einer amperometrischen Elektrode gemessen wird.

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von Biosensoren, die nach dem letztgenannten Prinzip arbeiten. Hierzu müssen die Enzyme coimmobilisiert werden, um die Umsetzung von Creatinin in das amperometrisch detektierbare Molekül Wasserstoffperoxid zu ermöglichen. Die Umsetzung von Creatinin zu Wasserstoffperoxid erfolgt nach den folgenden Reaktionsschritten:



An der amperometrischen Elektrode wird Wasserstoffperoxid anodisch bei -350 mV gegen Ag/AgCl oxidiert. Der dabei fließende Strom ist der Creatininkonzentration proportional.



Der bei der Elektrodenreaktion rückgewonnene Sauerstoff wird zur Oxidation des Sarkosins weiterverwendet.

Im Stand der Technik sind mehrere Arten zur Immobilisierung der drei verwendeten Enzyme bekannt. Gemäß T. Tsuchida, K. Yoda, Clin. Chem. 29/1, S. 51, 1983, werden alle drei Enzyme mit Glutardialdehyd vernetzt.

Diese Methode der Immobilisierung besitzt jedoch den Nachteil, daß mit einem derartig hergestellten Biosensor nur eine geringe Signalthöhe erreicht wird, d.h. nur eine geringe Stromänderung feststellbar ist, da die derart immobilisierte Sarkosinoxidase fast ihre gesamte Aktivität verliert. Eine möglichst große Signalthöhe ist jedoch speziell bei der Creatininbestimmung besonders wichtig, weil die Creatininkonzentration vor allem in Blut äußerst niedrig ist (ca. 50 μM) und zudem die Creatinase nur in sehr geringen spezifischen Aktivitäten (max. 20 iu/mg) erhältlich ist. Weiters weist ein derart immobilisierter Sensor hohe Ansprechzeiten auf.

In der US-A - 5,466,575 ist ein Verfahren beschrieben, bei dem Sarkosinoxidase und Creatininase in einem photovernetzbaaren Fisch-Gel immobilisiert und anschließend mit Creatinase in einem filmbildenden Polyvinylacetat-co-vinylalkohol-Latex überschichtet werden.

Nachteilig hierbei ist jedoch die aufwendige Photovernetzung, die eine einfache Herstellung des Biosensors unmöglich macht.

Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, ein Verfahren der eingangs genannten Art bereitzustellen, das die oben genannten Nachteile und Schwierigkeiten überwindet. Insbesondere soll das erfindungsgemäße Verfahren eine einfache Herstellung eines Biosensors ermöglichen, mit welchem sowohl kurze Ansprechzeiten als auch große Signalthöhen erzielbar sind. Insbesondere soll die Immobilisierung der Enzyme bei Raumtemperatur möglich sein.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ein Enzym mit einem oder mehreren oberflächenaktiven Stoffen in wäßriger Lösung auf die Arbeitselektrode aufgebracht und trocknen gelassen wird und das zumindest zweite Enzym in einem nachfolgenden Schritt darauf chemisch immobilisiert wird.

Für die Zwecke der vorliegenden Beschreibung und Patentansprüche soll der Begriff "oberflächenaktive Stoffe" Stoffe, die oberflächenaktive Eigenschaften besitzen, wie Detergenzien und Alkohole, beispielsweise Glycerin, umfassen.

Vorzugsweise werden als oberflächenaktive Stoffe Polyalkohole und/oder Detergenzien, bevorzugt nichtionische Tenside, eingesetzt.

Es wurde festgestellt, daß durch diese Zusätze der gemessene Strom im Vergleich zu Biosensoren mit drei gleich immobilisierten Enzymen um ca. Faktor 40 erhöht wird.

Das zumindest zweite Enzym wird zweckmäßig durch Cross-linking, kovalente Bindung oder Matriceinschluß immobilisiert. Vorzugsweise wird die Immobilisierung mittels Glutardialdehyd bewirkt.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird nach der Immobilisierung der Enzyme eine Deckmembran aufgebracht. Eine solche Membran, z.B. aus Nafion, PVC-Copolymer oder Celluloseacetat, erhöht vorteilhaft die Linearität der Sensoren und bewirkt zusätzlich eine Reduktion von Interferenzeinflüssen.

Ein erfindungsgemäßer Biosensor, welcher eine Arbeits-, eine Referenz- und eine Gegenelektrode aufweist und dessen Enzyme mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens immobilisiert wurden, ist dadurch gekennzeichnet, daß die Referenzelektrode eine Ag/AgCl-Elektrode ist, die Gegenelektrode eine Kohlenstoffelektrode ist, die Arbeitselektrode aus Kohlenstoff, Metall, Metalloxiden oder einer Mischung aus Kohlenstoff und Metall oder Metalloxiden besteht und die Elektroden auf einem nicht leitenden Substrat aufgebracht sind.

Insbesondere ist ein erfindungsgemäßer Biosensor zur Bestimmung von Creatinin dadurch gekennzeichnet, daß an der Arbeitselektrode Sarkosinoxidase adsorbiert ist und darauf Creatininase und Creatinase immobilisiert sind.

In einer bevorzugten Ausgestaltung ist der Biosensor aus zwei Dreielektrodensystemen aufgebaut, welches erste Elektrodensystem mit den Enzymen Creatininase, Creatinase und Sarkosinoxidase zur Bestimmung der Summe von Creatinin und Creatin und welches zweite Elektrodensystem mit den Enzymen Creatinase und Sarkosinoxidase zur Bestimmung von Creatin dient, wobei das Ergebnis des zweiten Elektrodensystems von jenem des ersten zur Bestimmung von Creatinin abgezogen wird.

Vorteilhaft umfaßt der Biosensor ein weiteres Elektrodensystem, welches zur Eliminierung von elektrochemischen Interferenzen dient.

Die Erfindung wird nachstehend durch die folgenden Beispiele weiter veranschaulicht:

Beispiel 1

Beispiel 1 zeigt die Verbesserung der Signalhöhe durch Erhöhung der Sarkosinoxidase-Aktivität bei erfindungsgemäßigem Zusatz von oberflächenaktiven Stoffen im Vergleich zum Stand der Technik.

Sarkosinoxidase wurde gelöst in Wasser (Stand der Technik) sowie in Wasser unter Zusatz von wasserlöslichen, oberflächenaktiven Komponenten (im vorliegenden Fall Glycerin sowie drei nichtionische Tenside) auf den amperometrischen Basissensor getropft und bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Nach erfolgter Polarisation der Elektrode wurde der Strom auf 1 mM Sarkosin gemessen. Das Ergebnis der Messung ist in Tabelle 1 angeführt.

Tabelle 1

Sarkosinoxidase (SOx)	Zusatz	Strom auf 1 mM Sarkosin
54,2 mg SOx in 0,5 ml H ₂ O	keiner	2 nA
54,2 mg SOx in 0,5 ml H ₂ O	5,0 % Glycerin	80 nA
54,2 mg SOx in 0,5 ml H ₂ O	0,5 % Tween 20	70 nA
54,2 mg SOx in 0,5 ml H ₂ O	0,5 % Triton X100	90 nA
54,2 mg SOx in 0,5 ml H ₂ O	0,5 % Brij 35	85 nA

Es zeigte sich, daß der Strom auf 1 mM Sarkosin durch Detergenzien bzw. Glycerin um ca. Faktor 40 erhöht werden konnte.

Diese enorme Stromerhöhung wird offenbar dadurch bewirkt, weil das Enzym beim Trocknen durch die Zusätze optimal geschützt wird und weil die oberflächenaktiven Eigenschaften der Zusätze zu einem besseren und innigeren Verbund mit der porösen Struktur der Wasserstoffperoxidelektrode führen.

Beispiel 2

Beispiel 2 zeigt die Verbesserung der Signalhöhe sowie die Verkürzung der Ansprechzeit eines erfindungsgemäßen Biosensors im Vergleich zu einem gemäß Stand der Technik (T. Tsuchida) hergestellten Biosensor.

Es wurden zwei vollständige Creatininsensoren hergestellt, wobei beim ersten Sensor alle drei Enzyme zusammen mit Glutardialdehyd vernetzt wurden und beim zweiten Sensor Sarkosinoxidase mit Tween 20 zuerst auf die Basiselektrode aufgebracht wurde und danach Creatininase und Creatinase mit Glutardialdehyd darauf immobilisiert wurden. Die

resultierenden Ströme bzw. Ansprechzeiten zur Messung von Creatinin bzw. Sarkosin sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2

Sarkosinoxidase	Strom auf 1 mM Creatinin	Strom auf 1 mM Sarkosin	Ansprechzeit (T90)
In Glutardialdehyd (Sensor 1)	120 nA	140 nA	80 s
In Tween 20 (Sensor 2)	420 nA	>500 nA	10 s

Es wurde mittels der erfindungsgemäßen Immobilisierung der Enzyme ein um ein Vielfaches höherer Strom gemessen. Die Ansprechzeit des erfindungsgemäß hergestellten Sensors war ebenfalls deutlich kürzer als jene des im Stand der Technik bekannten Sensors.

Beispiel 3

In Beispiel 3 ist die Herstellung eines erfindungsgemäßen Creatinin-Biosensors beschrieben.

Auf einem elektrisch nicht leitenden Substrat aus Kunststoff oder Keramik werden mittels Siebdruckverfahren Ag-Leiterbahnen für Referenz-, Gegen- und Arbeitselektroden gedruckt. Die Referenzelektrode wird zumindest im Sensorbereich aus einer Ag/AgCl-Paste hergestellt. Die Gegenelektrode wird im Meßbereich mit einer Schicht Carbonpaste bedruckt. Mit derselben Carbonpaste wird die Ag-Leiterbahn der Arbeitselektrode in den Meßbereich verlängert. Im Meßbereich der Arbeitselektrode wird eine Mischung aus 5 % Mangandioxid in Carbonpaste als Arbeitselektrode gedruckt. Im Anschluß wird das gesamte System mit Ausnahme der später mit Flüssigkeit zu kontaktierenden Elektrodenspots und der dem Signalabgriff dienenden Leiterbahnen mehrfach mit einem Isolationslack überzogen. Danach wird die Arbeitselektrode mit Sarkosinoxidase in Tween 20 - Lösung aufgetropft und trocknen gelassen. Hierauf werden die anderen Enzyme mittels Glutardialdehyd immobilisiert. Zur Erhöhung der Linearität und zur Verminderung von störenden Einflüssen wird eine Deckmembran aufgebracht.

Um Creatinin interferenzfrei bestimmen zu können, sind zumindest zwei Dreielektrodensysteme nötig; ein System mit den Enzymen Creatininase, Creatinase und Sarkosinoxidase, welches Creatinin und Creatin bestimmt, sowie ein weiteres mit den Enzymen Creatinase und Sarkosinoxidase, mit welchem Creatin bestimmt werden kann. Da

014257

Creatin im Blut als Interferent vorkommt, muß der gemessene Creatinwert vom Meßwert der Creatininelektrode abgezogen werden, der sich aus Creatin und Creatinin zusammensetzt.

Um weitere elektrochemische Interferenzen zu eliminieren, kann ein drittes Elektrodensystem mit immobilisierter Sarkosinoxidase allein (Creatin wird durch ein inaktives Protein, z.B. Albumin ersetzt) verwendet werden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Biosensoren mit mindestens zwei Enzymen zur amperometrischen Bestimmung enzymatisch abbaubarer Stoffe, wie Creatinin, in biologischen Flüssigkeiten, wobei die Enzyme an einer Arbeitselektrode immobilisiert werden, dadurch gekennzeichnet, daß ein Enzym mit einem oder mehreren oberflächenaktiven Stoffen in wäßriger Lösung auf die Arbeitselektrode aufgebracht und trocknen gelassen wird und das zumindest zweite Enzym in einem nachfolgenden Schritt darauf chemisch immobilisiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als oberflächenaktive Stoffe Polyalkohole und/oder Detergenzien, vorzugsweise nichtionische Tenside, eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das zumindest zweite Enzym durch Cross-linking, kovalente Bindung oder Matrixeinschluß immobilisiert wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das zumindest zweite Enzym mittels Glutardialdehyd immobilisiert wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß nach der Immobilisierung eine Deckmembran aufgebracht wird.
6. Biosensor mit Arbeits-, Referenz- und Gegenelektrode, hergestellt mittels des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Referenzelektrode eine Ag/AgCl-Elektrode und die Gegenelektrode eine Kohlenstoffelektrode ist und die Arbeitselektrode aus Kohlenstoff, Metall, Metalloxiden oder einer Mischung aus Kohlenstoff und Metall oder Metalloxiden besteht, wobei die Elektroden auf einem nicht leitenden Substrat aufgebracht sind.
7. Biosensor nach Anspruch 6 zur Bestimmung von Creatinin, dadurch gekennzeichnet, daß an der Arbeitselektrode Sarkosinoxidase adsorbiert ist und darauf Creatininase und Creatinase immobilisiert sind.
8. Biosensor nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß er aus zwei Dreielektrodensystemen aufgebaut ist, welches erste Elektrodensystem mit den Enzymen Creatininase, Creatinase und Sarkosinoxidase zur Bestimmung der Summe von Creatinin und Creatin und welches zweite Elektrodensystem mit den Enzymen Creatinase und

014255

Sarkosinoxidase zur Bestimmung von Creatin dient, wobei die beiden Ergebnisse zur Bestimmung von Creatinin subtrahiert werden.

9. Biosensor nach Anspruch 8, welcher ein weiteres Elektrodensystem umfaßt, das zur Eliminierung von elektrochemischen Interferenzen dient.

014255

Zusammenfassung:

Creatinin-Sensor

Bei einem Verfahren zur Herstellung von Biosensoren mit mindestens zwei Enzymen zur amperometrischen Bestimmung enzymatisch abbaubarer Stoffe, wie Creatinin, in biologischen Flüssigkeiten, wobei die Enzyme an einer Arbeitselektrode immobilisiert werden, wird ein Enzym mit einem oder mehreren oberflächenaktiven Stoffen in wässriger Lösung auf die Arbeitselektrode aufgebracht und trocknen gelassen und wird das zumindest zweite Enzym in einem nachfolgenden Schritt darauf chemisch immobilisiert, woraus kürzere Ansprechzeiten und größere Signalthöhen für den Biosensor resultieren.